УДК 591.111.05:(576.895.122:594.38)

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ БЕЛКОВ КРОВИ ПРУДОВИКА ОЗЕРНОГО — *LYMNAEA STAGNALIS* (L. 1758) (GASTROPODA, PULMONATA) — В НОРМЕ И ПРИ ИНВАЗИИ ЛИЧИНОЧНЫМИ ФОРМАМИ ТРЕМАТОД

А. П. Стадниченко

(Астраханский технический институт рыбной промышленности и хозяйства)

В связи с изучением воздействия паразитов на организм их облигатных промежуточных хозяев несомненный интерес представляет определение аминокислотного состава белков моллюсков, инвазированных личиночными формами трематод. Однако этот вопрос начали изучать лишь в последние годы.

Таргетт (Targett, 1962а) исследовал аминокислотный состав гемоглобина у четырех видов моллюсков семейств Planorbidae и Bulinidae и у прудовика озерного — *Lymnaea stagnalis* (L., 1758). Его другая работа посвящена влиянию личинок возбудителя менсоновского шистосомоза — *Schistosoma mansoni* — на содержание свободных аминокислот в крови их облигатных промежуточных хозяев — пресноводного брюхоногого моллюска аустралорбис глабратус (*Australorbis glabratus*). Данные по качественному набору аминокислот у прудовика озерного находим у Брахмачари и Бхаттахария (Brahmachary, Bhattacharya, 1963) и Брахмачари (1964). Аналогичные материалы по морским видам моллюсков приводит Негус (Negus, 1968). В литературе имеются также сведения об аминокислотном составе гидролизатов белков пищеварительной и гермафродитной желез и некоторых других органов пресноводных (Targett, 1962б) и морских (Lins, Borges, Ghersmann, 1955; Bierbaum, 1964) моллюсков. Работ, посвященных влиянию паразитирования личинок трематод на аминокислотный состав растворимых белков крови, нет.

Мы исследовали изменения в качественном составе и количественном содержании аминокислот в гидролизате растворимых белков крови прудовика озерного в норме и при инвазии моллюсков личинками *Opisthioglyphe ranae* L o o s s, 1887 (=*Cercaria gibba* S i n i t z i n, 1905), *Sanguinicola* sp. (? *Cercaria cristata* La V a l e t t e, 1852), а также при одновременной инвазии обоими видами трематод.

Материал был собран в пруду ботанического сада Львовского университета (лесопарк «Погулянка»). Чтобы исключить влияние возрастной и сезонной изменчивости на результаты исследования, мы отбирали моллюсков приблизительно одного возраста (об этом свидетельствовала высота раковин), собранных в сжатые сроки — конец мая — начало июня 1968 г. Общие сведения об изученных прудовиках озерных приведены в табл. 1 *.

Кровь моллюсков получали по методике, описанной Таргеттом (1962в). Белки осаждали 25%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Полученный осадок с целью экстрагирования липоидных фракций последовательно промывали эфиром, этанолом и ацетоном. Гидролиз и подготовку гидролизата к нанесению на хроматограммы производили по

* Цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики, приведенными в работе М. Ф. Деркача (1963).

Таблица 1

Результаты измерения высоты раковины у прудовиков озерных, зараженных личинками трематод и не инвазированных

Инвазия	Исследовано моллюсков (в экз.)	Высота раковины (в *мм*)			
		M	m	σ	C
Нет	50	38,60	0,60	1,91	4,95
Личинками *Opisthioglyphe ranae*	25	38,20	0,60	1,90	4,83
Личинками *Sanguinicola* sp.	40	39,30	0,47	1,48	3,76
Личинками *O. ranae* и *Sanguinicola* sp.	10	38,80	0,59	1,87	4,82

методике Пасхиной (1954). Хроматограммы ставились нисходящие, использовали «ленинградскую» хроматографическую бумагу. Для разделения глицина, серина, треонина, метионина, валина, глутаминовой и аспарагиновой кислот в качестве растворителя применяли смесь 1 н. раствора бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 5 : 1 : 4. Для остальных аминокислот брали растворитель, приготовленный из тех же компонентов, взятых в соотношении 8 : 3 : 1.

Аминокислоты на хроматограммах проявляли 0,5%-ным раствором нингидрина в 95%-ном растворе ацетона, содержащем 1% ледяной уксусной кислоты. Для определения количественного содержания аминокислот измеряли экстинкцию элюатов пятен аминокислот на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 510 по соответствующим калибровочным кривым, полученным для стандартных растворов аминокислот (ФЭК № 54, фильтр № 4, кюветы 5 *мм*). Определяли количественное содержание каждой аминокислоты, кроме метионина и валина, а также лейцина и изолейцина, которые не всегда хорошо разделялись, и поэтому приведена их сумма. Пролин и триптофан не выделяли.

В гидролизате белков крови свободных от инвазии прудовиков озерных мы обнаружили 17 аминокислот (табл. 2). Качественных изменений в составе аминокислот белков крови не было, но количественное содержание отдельных аминокислот у зараженных моллюсков существенно отклонялось от нормы.

Личинки *Opisthiogliphe ranae* — дочерние спороцисты и сформированные церкарии — локализовались преимущественно на поверхности желудка и кишки. Пищеварительную железу личинки трематод поражали редко, и, как правило, интенсивность инвазии была очень незначительной. Как показали наши наблюдения, у животных, инвазированных личинками *O. ranae*, количественное содержание некоторых аминокислот значительно изменялось. Из табл. 2 видно, что заражение моллюсков личинками *O. ranae* вызвало снижение содержания в белках крови 10 аминокислот. Наряду с этим у зараженных особей значительно возросло количество аргинина. Все отмеченные различия являются статистически достоверными. В содержании остальных аминокислот не наблюдалось существенных различий между белками крови у инвазированных и свободных от инвазии животных.

Личинки *Sanguinicola* sp.— спороцисты и сформированные церкарии — локализовались только в пищеварительной железе прудовиков озерных. У моллюсков, зараженных этим видом трематод, в белках кро-

Таблица 2

Содержание аминокислот (в *мг* на 100 *мг* белка) в гидролизате белков крови прудовиков озерных, не инвазированных и инвазированных личинками трематод

Аминокислота	Отсутствие инвазии				Инвазия личинками *Opisthioglyphe ranae*			
	M	σ	m	C	M	σ	m	C
Цистин	4,25	1,83	0,57	43,08	2,30	1,35	0,42	60,00
Лизин	3,99	2,13	1,07	55,89	0,36	0,28	0,08	77,77
Гистидин	4,50	0,76	0,24	16,80	2,30	0,52	0,16	22,61
Аргинин	1,30	0,91	0,28	70,00	2,99	1,56	0,49	52,17
Аспарагиновая кислота	9,55	2,64	0,83	27,64	7,65	1,36	0,43	17,77
Серин	5,35	0,43	0,13	8,04	4,92	0,85	0,27	12,27
Глицин	5,11	1,19	0,38	23,29	3,78	0,65	0,21	17,19
Глутаминовая кислота	4,60	0,42	0,13	9,13	3,95	1,27	0,38	34,68
Треонин	4,64	0,70	0,25	15,09	3,25	0,88	0,28	26,11
Аланин	2,64	0,67	0,23	8,71	2,04	0,61	0,19	25,00
Тирозин	1,84	0,43	0,15	23,36	1,71	1,49	0,47	87,13
Метионин и валин	3,01	0,49	0,17	16,28	0,69	0,08	0,03	11,80
Фенилаланин	5,63	1,63	0,54	27,17	1,45	0,82	0,26	56,55
Лейцин и изолейцин	10,88	1,31	0,46	12,04	3,03	1,01	0,32	33,33

Аминокислота	Инвазия личинками							
	Sanguinicola sp.				*O. ranae* и *Sanguinicola* sp.			
	M	σ	m	C	M	σ	m	C
Цистин	1,57	0,27	0,14	17,19	4,83	0,05	0,03	1,03
Лизин	0,75	0,78	0,39	10,40	0,37	0,05	0,03	13,51
Гистидин	1,25	0,29	0,15	23,20	1,85	0,08	0,04	14,33
Аргинин	2,88	0,49	0,25	17,01	2,20	0,17	0,08	7,73
Аспарагиновая кислота	1,88	1,99	0,99	10,60	6,52	0,49	0,25	7,51
Серин	2,18	0,03	0,02	1,37	3,82	0,05	0,03	1,05
Глицин	0,53	0,04	0,02	9,43	3,75	0,49	0,25	13,07
Глутаминовая кислота	1,75	0,05	0,03	2,86	1,92	0,09	0,05	4,68
Треонин	1,33	0,05	0,03	3,76	1,28	0,05	0,03	3,91
Аланин	0,41	0,02	0,01	5,00	1,80	0,25	0,13	13,89
Тирозин	0,58	0,14	0,07	24,13	0,90	0,01	0,01	1,11
Метионин и валин	1,53	0,05	0,03	3,27	1,13	0,31	0,16	27,43
Фенилаланин	—	—	—	—	1,00	0,18	0,09	18,00
Лейцин и изолейцин	-	—	—	—	1,50	0,08	0,04	5,33

Примечание: прочерк — ничтожно малое количество.

ви также снижается содержание многих аминокислот. Однако следует отметить, что в последнем случае изменения в содержании аминокислот были более значительными. Как и при инвазии моллюсков личинками *O. ranae*, в гидролизате белков крови заметно снизилось содержание цистина, лизина, глицина, треонина, метионина и валина, лейцина и изолейцина и возросло содержание аргинина. Вместе с тем, у прудовиков озерных, инвазированных личинками *Sanguinicola* sp., уменьшилось также содержание гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, аланина, тирозина и фенилаланина. Причем концентрация фенилаланина, лейцина и изолейцина была так ничтожно мала, что количественное содержание этих аминокислот невозможно было установить. Отклонение

от нормы лизина оказалось недостоверным и, вероятнее всего, было вызвано большой индивидуальной изменчивостью.

При одновременной инвазии прудовиков озерных личинками *O. ranae* и *Sanguinicola* sp. значительно изменяется содержание всех аминокислот в гидролизате белков крови, кроме цистина. Если при заражении моллюсков личинками *O. ranae* или личинками *Sanguinicola* sp. содержание цистина снижалось в сравнении с нормой, то при одновременной инвазии животных статистически достоверных сдвигов в содержании последнего установлено не было. Количество всех остальных аминокислот в сравнении с количеством их у свободных от инвазии животных резко уменьшалось. Было установлено, что при одновременном заражении прудовиков озерных личинками *O. ranae* и *Sanguinicola* sp., как и при заражении моллюсков каждым видом паразита в отдельности, происходит статистически достоверное увеличение содержания аргинина.

Т. о., анализ изученного материала показывает, что заражение моллюсков личиночными формами трематод сопровождается значительными нарушениями количественного содержания аминокислот в гидролизатах белков крови. Это хорошо согласуется с данными Таргетта (1962б). Степень этих нарушений, как показали исследования, зависит от локализации личинок трематод.

Известно, что у моллюсков, как и у многих других животных, большинство белков синтезируется в пищеварительной железе («печени»), откуда они и поступают в кровь. При высокой интенсивности инвазии этой железы личинками трематод в ней наблюдаются глубокие гистопатологические изменения, сопровождающиеся некротическим распадом тканей. Очевидно, белкообразовательная функция пищеварительной железы при этом снижается. В пользу такого предположения говорит то,

Таблица 3

Результаты биометрического сравнения содержания аминокислот в гидролизате белков крови прудовиков озерных, свободных от инвазии и инвазированных личинками трематод

Аминокислота	Инвазия личинками					
	Opisthioglyphe ranae		*Sanguinicola* sp.		*O. ranae* и *Sanguinicola* sp.	
	Коэффициент Стьюдента	Степень достоверности различий	Коэффициент Стьюдента	Степень достоверности различий	Коэффициент Стьюдента	Степень достоверности различий
Цистин	2,7	99,9	4,5	98,0	1,0	60,9
Лизин	3,4	99,2	2,8	93,2	2,8	95,1
Гистидин	5,4	99,9	11,6	99,9	11,0	99,9
Аргинин	2,9	99,9	4,3	97,7	3,1	96,4
Аспарагиновая кислота	2,1	93,5	5,8	99,9	2,7	94,6
Серин	1,1	70,0	3,8	98,1	11,5	99,9
Глицин	3,1	99,9	11,7	99,9	3,0	96,0
Глутаминовая кислота	1,6	85,6	25,9	99,9	16,3	99,9
Треонин	3,6	99,9	4,2	98,6	13,4	99,9
Аланин	2,2	94,5	9,7	99,9	3,2	96,7
Тирозин	0,3	22,9	7,4	99,9	6,3	99,9
Метионин и валин	7,5	99,9	8,6	99,9	8,2	99,9
Фенилаланин	6,9	99,9	—	—	8,4	99,9
Лейцин и изолейцин	14,0	99,9	—	—	20,4	99,9

Примечание: прочерк — ничтожно малое количество.

что при заражении прудовиков озерных личинками трематод, локализующимися в пищеварительной железе, в крови моллюсков резко сокращается общее содержание растворимых белков по сравнению с содержанием их в крови животных, у которых личинки трематод локализуются в полости тела (Стадниченко, 1969). Сказанное выше подтверждают и результаты настоящего исследования. Оказалось, что нарушения в содержании аминокислот в белках крови у моллюсков, инвазированных личинками *O. ranae*, локализовавшимися в основном в полости тела меньше, чем у животных, инвазированных личинками *Sanguinicola* sp. (табл. 3). Совместное поражение прудовиков озерных личинками *O. ranae* и *Sanguinicola* sp. вызывает самые глубокие нарушения в количественном содержании аминокислот.

Уменьшение содержания определенных аминокислот может сказываться на ряде метаболических процессов в организме моллюсков. Известно, например, что метионин и цистин участвуют в обмене серы в организме, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты играют существенную роль в обмене азота, гистидин входит, как полагают, в состав активной группы эстераз. Не менее важны и остальные аминокислоты. Следовательно, заражение моллюсков личиночными формами трематод должно вызывать более или менее существенные сдвиги во всех процессах, протекающих в организме моллюсков. Однако эти предположения должны быть тщательно проверены на экспериментальном материале.

ЛИТЕРАТУРА

Деркач М. П. 1963. Елементи статистичної обробки результатів біологічного експерименту. Львів.
Здун В. І. 1961. Личинки трематод в прісноводних молюсках України. К.
Пасхина Т. С. 1954. Количественное определение аминокислот на хроматограммах при помощи реакции с нингидрином. Биохимия, т. 19, в. 6.
Стадниченко А. П. 1969. Изменчивость белкового спектра крови Lymnaea stagnalis (L., 1758) как результат инвазии личиночными формами трематод. В сб.: «Пробл. паразитол.», ч. I, К.
Brahmachary R. L., Bhattacharya A. 1963. Free amino-acids in the snail Lymnaea and their changes with morphogenesis, Experientia, v. 19, fasc. 3.
Brahmachary R. L. 1964. The amino-acids in Lymnaea. Experientia, v. 20.
Lins M., Borges S., Ghersmann L. 1955. Composicao em eminoácidos da ostra e do aruá, An. Fac. med. Univ. Recife, v. 79, № 2.
Negus M. R. 1968. Oxygen consumption and amino-acid levels in Hydrobia ulvae (Pennant) in relation to salinity and behavior. Compar. Biochem. and Physiol., v. 24, № 2.
Targett G. A. T. 1962a. The amino-acid composition of blood from snail hosts of shistosomiasis. Ann. Trop. Med. and Parasitol., v. 56, № 1.
Его же. 1962б. A study of amino-acids present in Lymnaea stagnalis, Planorbarius corneus and Australorbis glabratus before and after infection with Schistosoma mansoni. Ann. Trop. Med. and Parasitol., v. 56, № 2.
Его же. 1962в. Absorption spectra of blood proteins from intermediate and non-intermediate hosts of schistosomes. J. Helmintology, v. 36, № 1/2.
Wright C. A. 1959. The application of paper chromatography to a taxonomic study in the mollusca genus Lymnaea. J. Linnean Soc., London.

Поступила 22.III 1969 г.

CONTENT OF AMINO ACIDS IN BLOOD PROTEINS OF *LYMNAEA STAGNALIS* (L., 1758) (GASTROPODA, PULMONATA) IN NORM AND INVASION WITH LARVA FORMS OF TREMATODES

A. P. Stadnichenko

(Technical Institute of Fish Industry and Fishery, Astrakhan)

Summary

The qualitative composition and quantitative content of amino acids were investigated by means of paper chromatography in blood protein hydrolyzate of *Lymnaea stagnalis* (L., 1758) in norm and in invasion with *Opisthioglyphe ranae* Looss, 1887, *Sanguinicola* sp. larvae as well as in the invasion of mollusks with these species of trematodes simultaneously.

A decrease in the amount of all amino acids during invasion is established. A dependence is found out between amino acid concentration and localization of the trematode larvae.